昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，July 2008，51(7)：700 - 706 ISSN 0454-6296

成年蜜蜂脑神经细胞的培养和电生理特征

周 婷[1]，王 强[1]，代平礼[1]，张毅力[2]，孙继虎[2,*]
(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所，北京 100093；2. 第二军医大学生理学教研室，上海 200433)

摘要：为了研究杀虫剂等对蜜蜂毒性作用的神经机制，需在体外建立成年蜜蜂脑神经细胞的分离培养和电生理记录技术并研究其正常电生理特征，而对成年蜜蜂脑神经细胞的分离培养和电生理特性的研究报道甚少。我们采用酶解和机械吹打相结合的方法获得了数量较多且活力较好的成年意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 脑神经细胞，并用全细胞膜片钳技术研究了成年意大利蜜蜂脑神经细胞对电流和电压刺激的反应，获得了成年意蜂脑神经细胞的基本电生理特征以及钠电流和钾电流的特性。全细胞电流钳的记录结果表明，在体外培养条件下，细胞无自发放电发生，注射电流后仅引起细胞单次放电，引起细胞放电的阈电流平均为 60.8 ± 6.3 pA；细胞动作电位产生的阈电位平均为 - 27.4 ± 2.3 mV。用全细胞电压钳记录了神经细胞的钠电流和钾电流。钠电流的分离是在电压刺激下通过阻断钾通道和钙通道实现。细胞的内向钠电流在指令电压为 - 40 ~ - 30 mV 左右激活，- 10 mV 达峰值，钠通道的稳态失活电压 $V_{1/2}$ 为 - 58.4 mV；外向钾电流成份至少包括较小的快速失活钾电流和和较大的缓慢失活钾电流(占总钾电流的 80%)，其半激活膜电位 $V_{1/2}$ 为 3.86 mV，无明显的稳态失活。结果提示缓慢失活钾电流的特征可能是细胞单次放电的机制之一。

关键词：蜜蜂；神经元；兴奋性；钠电流；钾电流；膜片钳
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2008)07-0700-07

Primary culture and electrophysiological properties of brain neurons of adult *Apis mellifera* (Hymenoptera：Apidae)

ZHOU Ting[1], WANG Qiang[1], DAI Ping-Li[1], ZHANG Yi-Li[2], SUN Ji-Hu[2,*] (1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China；2. Department of Physiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract：To explore the neuronal mechanisms underlying pesticides intoxication in adult honeybees, the primary culture of brain neurons of adult honeybees and electrophysiological recordings are required. However, little is known of the electrophysiological properties and sodium currents or potassium currents in normal adult honeybee brain neurons. We first dissociated neurons from brains of adult *Apis mellifera* by gentle trituration after a 15-min incubation with papain. This preparation resulted in a large number of isolated viable neurons. Using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique, we investigated the neuronal responses of the isolated neurons to the current or voltage stimulation. Current-clamp data showed that the tested neurons showed no spontaneous discharges but were capable of firing a single action potential in response to depolarizing current injection. The mean current threshold for action potential was 60.8 ± 6.3 pA and the mean voltage threshold - 27.4 ± 2.3 mV. Under voltage clamp, sodium currents were isolated by blockade of potassium channel and calcium channel. The sodium current was activated at command potentials more positive than - 40 mV with a maximum around - 10 mV and a half-maximal voltage for inactivation of - 58.4 mV. The neurons expressed at least two distinct K^+ currents, a small transient current and a large sustained current (80% of total K^+ current) with a half-maximal voltage for activation of 3.86 mV. The large sustained potassium current showed little or no inactivation. The results suggest that the prominent sustained potassium current might

基金项目：国家自然科学基金项目(30571408)；国家'973'项目(2007CB109203)；农业公益性行业科研专项(nyhyzx07-041)
作者简介：周婷，女，1958 年 4 月生，江苏无锡人，博士，研究员，研究方向为蜜蜂病理学，E-mail：ztapis@263.net
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail：sunjihu@yeah.net
收稿日期 Received：2008-02-27；接受日期 Accepted：2008-05-12

account for the a single spiking in the recorded adult honeybee neurons.

Key words: *Apis mellifera*; neuron; excitability; sodium current; potassium current; whole-cell patch-clamp

蜜蜂农药中毒的情况与年俱增，且来势迅猛，常常引起整个蜂场全群覆没，特别是发生在大的蜂蜜和蜂王浆生产期，给养蜂业带来巨大的经济损失。杀虫剂是如何引起蜜蜂中毒的确切机理到目前为止还不清楚。但在除蜜蜂之外的其他昆虫上的研究表明，大部分杀虫剂都是神经毒。例如，拟除虫菊酯类杀虫剂可引起神经末梢去极化，造成神经系统的过度兴奋从而导致运动失调、惊厥抽搐、易激惹、震颤等。神经细胞膜上的离子通道是神经细胞正常兴奋性产生的基础，许多杀虫剂的神经毒性作用主要就是通过影响神经细胞膜上的各种不同的离子通道，改变神经细胞的兴奋性，或干扰神经细胞之间的突触传递即兴奋性的传导导致的（Soderlund *et al*.，2002）。

神经细胞的功能基于细胞正常的电生理活动，离子通道是细胞电生理活动的基础。电压钳和膜片钳技术是研究细胞膜离子通道最基本和最直接的电生理学实验方法。膜片钳技术（patch clamp）是在电压钳基础上发展起来的一种新技术，它能分辨通过细胞膜上单个通道的电流，从而可以对通道电流的电导及其动力学特征、药理学特征以及通道的调节机制进行深入研究。离子通道是多种天然毒素及合成杀虫剂的基本作用靶标（欧晓明等，2003），因此膜片钳技术为杀虫剂作用机理等的研究提供了有力武器。在体外培养的细胞上，利用膜片钳方法可迅速判明杀虫剂是否作用于离子通道、何种离子通道等问题。应用膜片钳技术研究蜜蜂神经细胞的电生理学特性在国外刚刚开始，主要在蜂蛹的神经细胞上进行（Wüstenberg *et al*.，2004；Barbara *et al*.，2005），在国内，这项工作还没有报道。我们将成年蜜蜂的神经细胞在体外分离成功，并对其基本电生理特征进行了观察，为进一步开展蜜蜂杀虫剂神经毒理的电生理机制研究奠定了基础。

1　材料和方法

1.1　成年蜜蜂神经细胞的分离和培养

意蜂 *Apis mellifera* 取自上海郊区蜂场。分离方法根据文献（Kreissl and Bicker，1992）改进。蜜蜂出巢后 2 天内，断头，从颅腔取出脑组织，放入冰的专门用于解剖蜜蜂的生理盐水。生理盐水组成（mmol/L）：NaC1 135，KC1 5，$MgCl_2$ 10，葡萄糖 25，蔗糖 180，HEPES 10；pH 6.6。撕去外膜，去除复眼、视叶等结构，保留前脑、中脑和后脑等部分。脑组织在消化液内 26℃消化 15 min。消化液组成：2 mL 生理盐水 + 木瓜酶（Roche 公司）100 μL。离心 1 min，速度 2 400rpm。去上清，L-15 培养液洗 3 次，终止消化。L-15 培养液配方：L-15 培养基（Gibco 公司），葡萄糖 4 g/L，蔗糖 24 g/L，果糖 2.5 g/L，脯氨酸 3.3 g/L，胎牛血清（Gibco 公司）13%，酵母提取液（Sigma）1.3%（v/v），双抗[1% 青霉素（100 U/mL）/ 链霉素（0.1 mg/mL）]（Life Technologies，Rockville，MD）4.5 mL，pH 7.2。用口径 100 μm 的玻璃滴管轻轻吹打，悬液沉定 3 min，将含有细胞的上清液吸到另一个离心管，加 L-15 培养液，细胞计数并调整细胞密度为 5×10^5/mL。

分散的神经元种植在预先涂有 0.1 mg/mL 多聚鸟氨酸和 1 mg/mL laminin（Mannheim，Germany）的盖玻片上。神经元贴壁 45 min 后，每个培养孔加入 1.5 mL L-15 培养液，放入 26 ± 1℃高度潮湿的培养箱内。培养 12 ~ 18 h 后，将盖玻片置于记录槽中，放于倒置相差显微镜（CKX31，Olympus Optical，Tokyo，Japan）载物台上，选择细胞直径为 18 ~ 22 μm 的圆形细胞进行电生理记录。

1.2　电生理记录

采用常规高阻抗封接的全细胞记录方式，封接电阻 > 1 GΩ，路径电阻 8 ~ 10 MΩ。放大器为 Axon 200B（Axon Instruments，Union City，CA），数模转换 Digidata 1320A，使用 pClamp 9.0 软件（Axon Instruments）采集分析数据。记录电极采用软质中性无芯玻璃管，外径 1.5 mm，于拉制仪（Narishige，PC-10）上分两步拉制成尖端微电极。电极尖端电阻 2 ~ 4 MΩ。记录细胞兴奋性时，电极内液成份（mmol/L）：K gluconate（Sigma）115，KF 40，KCl 20，$MgCl_2\cdot6H_2O$ 3，$CaCl_2\cdot2H_2O$ 1，EGTA 11，HEPES 10，Mg-ATP（Sigma）2，Li-GTP（Sigma）2，Sucrose 120，pH 用 Tris-base 调至 6.7。记录钠电流时，电极内液成份（mmol/L）：Cs-fluoride（Sigma）120，TEA-Cl（Sigma）30，$MgCl_2\cdot6H_2O$ 2，$CaCl_2\cdot2H_2O$ 1，EGTA 11，HEPES 10，Mg-ATP 2，Li-GTP 2，Sucrose 160，pH 用 Tris-base 调至 6.7。当电极贴近细胞后不给予或给予很小的负压即可形成高阻抗封接（封接电阻 > 1 GΩ），给负

压吸破细胞膜后形成全细胞模式。滤波 1 kHz,数据采集频率 20 kHz。记录槽外液灌流(2 ~ 3 mL/min),外液成份(mmol/L):NaCl 130,KCl 6,$CaCl_2$ 5,$MgCl_2 .6H_2O$ 4,HEPES 10,glucose 25,Sucrose 160,pH 用 Tris-base 调至 6.7。记录钾电流时,细胞外液中的 Na^+ 用 $NMDG^+$ 替代。药品除特别注明外均为国产分析纯。

所获数据以均数 ± 标准差表示。电压依赖的电流激活用 Boltzmann 方程拟合,公式为:$G/G_{max} = 1/(1 + \exp[V_{1/2} - V_m/k])$,$G$ 代表电导,G_{max} 代表最大电导,$V_{1/2}$ 为电流达到最大值一半时的膜电位,V_m 为测试电压,k 为激活曲线的斜率。其中,$G = I/(V_m - V)$,I 为激活电流,V_m 为测试电压,V 为根据 Nernst 方程计算的电流的逆转电位。

2 结果

2.1 成年蜜蜂神经细胞的分离

电生理记录通常选用单个分散的圆形细胞,对细胞的形态和活力要求相对比较高。我们首先采用单纯机械吹打的方法,但得到的单个细胞的比例相对较少,成对的或成团的细胞相对较多,而且细胞的活力也较低,因此,单纯机械吹打分离的细胞不利于电生理研究。为此,我们采用了酶解和机械吹打相结合的方法,分离的细胞中,单个细胞的比例明显增加,占细胞总数的 68% ± 8%(n = 16 次分离)。细胞种植 45 min 后,细胞下沉并贴附到盖玻片上,在相差显微镜下,细胞多呈圆形,立体感强,胞体周围有晕,提示细胞的活力较好(图 1)。分离后,少数细胞还保留轴突样结构。由于分离的是从成蜂颅内取出的整个脑组织包括前脑、中脑和后脑等部分,分离的神经细胞大小不一。

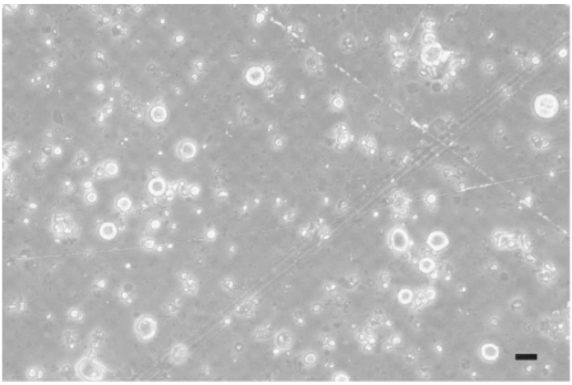

图 1 急性分离的成年蜜蜂脑神经细胞(标尺:10 μm)

Fig. 1 The acutely dissociated brain neurons of adult *Apis mellifera* (bar = 10 μm)

2.2 成年蜜蜂神经细胞的一般电生理特性

电生理记录选择的神经细胞为单个分散的圆形细胞,立体感强,胞体周围有晕。记录细胞的直径在 18 ~ 22μm,细胞电容平均为 17.19 ± 1.15 pF (n = 67)。细胞吸破后,立即在全细胞膜片钳电流钳模式下记录细胞的静息电位,平均为 − 78 ± 5 mV(n = 43)。由于电极内液扩散到细胞内的缘故,记录到的静息电位数值可能与真正的静息电位稍有不同(Pusch and Neher, 1988)。在电流钳模式下,根据注射电流和膜电位变化关系的直线斜率,计算出细胞的输入膜阻抗,平均为 1.3 ± 0.2 GΩ(n = 25)。

在电流钳记录模式下,可观察神经元的膜电位变化。在体外所记录的蜜蜂神经元中,神经元没有出现自发放电的现象。为了观察神经元的兴奋性,在电流钳记录的模式下,给细胞注射去极化电流,观察引起细胞产生动作电位的最小电流强度,即阈电

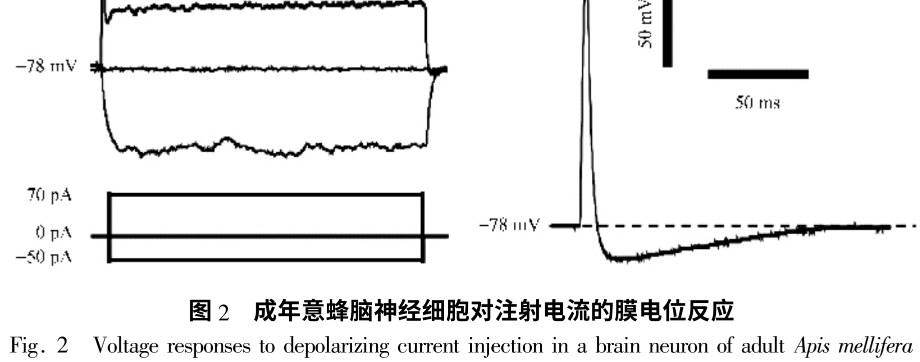

图 2 成年意蜂脑神经细胞对注射电流的膜电位反应

Fig. 2 Voltage responses to depolarizing current injection in a brain neuron of adult *Apis mellifera*

A:用时程 400 ms 的去极化电流诱发单个放电;B:时程 2ms 的阈上电流在同一细胞上诱发动作电位的形状。A: An injection of depolarizing current with a duration of 400 ms evoked a single spike; B: The shape of action potential evoked by a suprathreshold current injection (duration, 2 ms) in the same neuron.

流(current threshold)。注射电流的时程为 400 ms，从 -50 pA 开始，逐步增加电流强度，每步增加幅度为 10 pA。当注射电流达到阈电流值时，通常诱导出单个动作电位(图 2：A)。在体外培养条件下，引起蜜蜂神经细胞产生动作电位的阈电流平均为 60.8 ± 6.3 pA(n = 25)。

动作电位的形状可以反映神经细胞的特征，计算动作电位产生的膜电位即阈电位(voltage threshold)。由于记录兴奋性变化时注射电流的长时程较长，诱导出的动作电位的形态容易变形，不适于测量动作电位形态的指标。本文选用注射电流的时程为 2 ms，强度大于阈电流即阈上刺激诱导动作电位，分析动作电位的形态指标。图 2(B)为在电流钳记录模式下记录到的一个蜜蜂神经细胞的动作电位。动作电位的幅度达 142 ± 4.6 mV(n = 16)。通过测量动作电位复极化 50% 时的动作电位宽度，计算出动作电位时程(action potential duration，APD)为 2.26 ± 0.23 ms (n = 16)。动作电位复极化到静息电位后出现后超极化(afterhyperpolarization，AHP)。从静息电位到 AHP 的最大超级化值为 AHP 的幅度，平均 20.8 ± 2.6 mV (n = 16)。阈电位根据动作电位上升支中上升速率超过 50 mV/ms 时的膜电位计算(Anderson *et al*.，1987)。分析结果显示，蜜蜂神经细胞动作电位产生的阈电位从 -35 mV 到 -19 mV 不等，平均为 -27.4 ± 2.3 mV(n = 16)。

表 1　培养的成年意蜂神经细胞的电生理特征

Table 1　The electrophysiological properties of brain neurons of adult Apis mellifera

	平均值 ± 标准差 Mean ± *SE*	例数 Number of neurons
静息电位 Resting potential (mV)	-78 ± 5	43
膜电阻 Membrane resistance (GΩ)	1.3 ± 0.2	25
电容 Capacitance (pF)	17.19 ± 1.15	67
阈电位 Voltage threshold (mV)	-27.4 ± 2.3	16
阈电流 Current threshold (pA)	60.8 ± 6.3	25

2.3　成年意蜂神经细胞钠电流

当膜电位到达阈电位水平时，电压门控钠通道大量开放，细胞发放动作电位。因此，Na^+ 通道是影响神经细胞兴奋性的一个重要离子通道。我们在全细胞电压钳模式下，对成年蜜蜂神经细胞的钠电流(I_{Na})进行了观察。为了分离 I_{Na}，K^+ 通道和 Ca^{2+} 通道分别用 Cs^+ 和 Cd^{2+} 阻断。神经细胞形成全细胞封接后，给予 -80 mV 电压钳制 500 ms，施加一组以 10 mV 递增的、波宽为 15 ms 的指令电压方波，诱发的膜内向电流为 I_{Na}(图 3：A)，I_{Na} 在给予无钠的外液后消失。图 3(B)显示的是每步指令电压激活锋电流的电流-电压关系(I-V)曲线(n = 18)，显示 I_{Na} 激活明显的电压依赖性。I_{Na} 在指令电压为 -40 ~ -30 mV 左右激活，-10 mV 达峰值，随后电压依赖性地减低。图 3 (C)为细胞施加一组以 5 mV 递增的、波宽为 500 ms 的指令电压方波后记录测试电压为 -10 mV时的 I_{Na}，电流稳态失活曲线(I/I_{max}-V)用 Boltzmann 方程拟合，钠通道的稳态失活电压 $V_{1/2}$ 为 -58.4 mV(图 3：D)。

2.4　成年蜜蜂神经细胞钾电流

钾电流为外向电流。根据对阻断剂的敏感性和激活电压的不同，钾电流大致分为快速失活钾电流(I_{KA})和缓慢失活钾电流(I_{KD})两种。记录钾电流时内向钙电流用 Cd^{2+} 阻断，外液中的 Na^+ 用大分子的 $NMDG^+$ 替代消除内向 Na^+ 电流。去极化电压从 -120 mV到 +60 mV 激活所有 K^+ 电流即总 K^+ 电流(IK)，而去极化电压从 -30 mV 到 +60 mV 主要激活缓慢失活钾电流不包括快速失活钾电流，两种去极化电压激活的电流相减代表快速失活钾电流。由于钙通道被 Cd^{2+} 阻断，所记录到的 K^+ 电流中不含钙激活 K^+ 电流成份。由图 4(A)为利用二步电压钳制方法在成年蜜蜂神经细胞上可记录到的 I_K，I_{KD} 以及 I_{KA}。钳制电压时程 250 ms，测试电压从 -90 mV ~ 60 mV，时程 400 ms，步幅 10 mV。图 4(B)为不同指令电压下 K^+ 电流的电流-电压关系曲线 (n = 16)，I_K 和 I_{KA} 的电流为电压激活的电流曲线锋值的平均值，I_{KD} 的电流为电压激活的电流曲线结束时所测电流的平均值。在总的 K^+ 电流中，I_{KD} 为主要成份，I_{KA} 所占比例很小。例如，膜电位到达 -30 mV 之后，I_{KD} 激活，在总的 K^+ 电流中，I_{KD} 所占比例达 80% 左右。根据 $G/G_{max} = 1/(1 + \exp[V_{1/2} - V_m/k])$ 方程拟合，I_{KD} 半激活膜电位 $V_{1/2}$ 为 3.86 mV。I_{KD} 无明显的稳态失活。

3　讨论

蜜蜂生物学的研究，比如杀虫剂对蜜蜂的毒性作用，转基因植物对蜜蜂的影响等都是以成年蜜蜂作为研究对象的，进一步研究蜜蜂神经毒理的机制，通常在神经细胞水平进行有关的电生理研究。但由于在体研究的复杂性和技术难度，在体外可控制实验条件下研究分离的神经细胞电生理变化成为越来越受欢迎的手段，但在体外获得足够数量的成年蜜

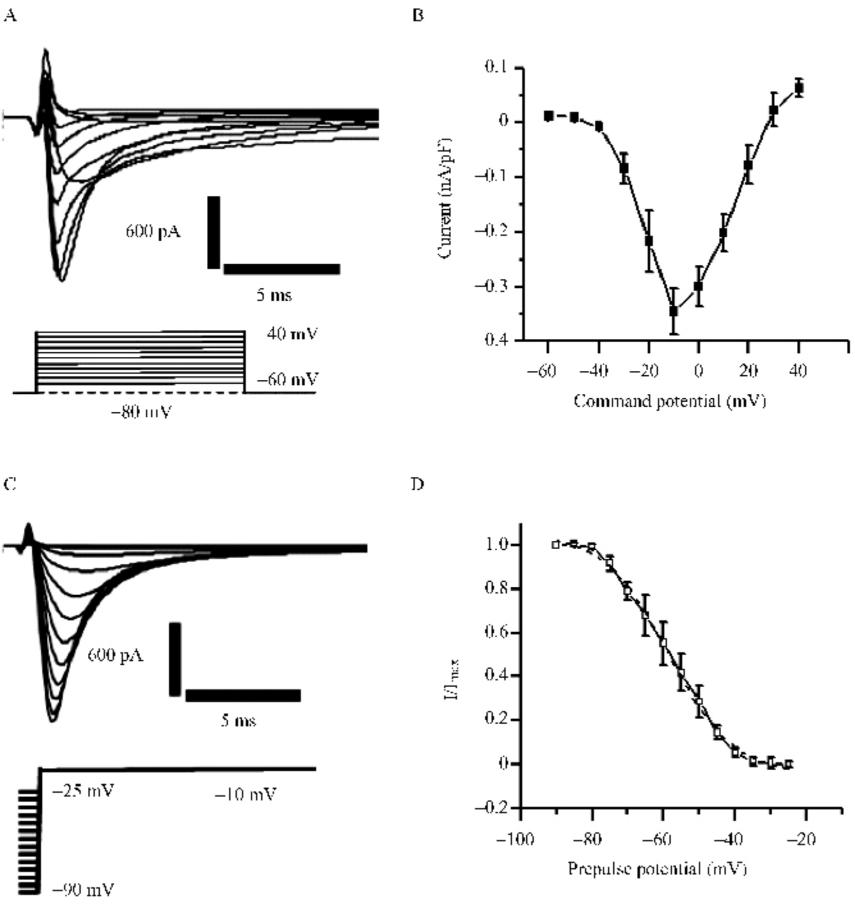

图3 成年意蜂脑神经细胞钠电流的激活和失活

Fig. 3 Sodium currents recorded in brain neurons of adult *Apis mellifera*

A：钠电流激活曲线示例。细胞 –80 mV 电压钳制 500 ms 后施加一组以 10 mV 递增的、波宽为 15 ms 的指令电压方波，诱发膜内向钠电流；B：根据 18 个神经元钠电流计算的电流-电压关系曲线；C：同一个神经元记录的钠电流稳态失活曲线示例；D：根据 Boltzmann 方程拟合的钠电流失活曲线。A：Representative traces for the activation of sodium current in a recorded neuron. Fifteen milliseconds voltage step ranging between –60 and +40 mV in 10 mV increments following a 500 ms conditioning step to –80 mV were used to evoke voltage-gated sodium currents. B：Current-voltage curve for sodium currents from 18 measurements as shown in A. C：Steady-state inactivation of sodium current was assessed in the same neuron as shown in A. Voltage-gated sodium current was evoked by a test pulse to –10 mV following a 1 s conditioning pulse varying between –90 and –25 mV, in 5 mV increments. D：Normalized inactivation curve (I/I_{max}). The mean was calculated and fitted with a Boltzmann equation.

蜂神经细胞是关键。本文报道了成年蜜蜂神经细胞的原代分离培养方法。文献报道的蜜蜂神经细胞的分离培养主要来自幼虫，分离方法采取机械性分离（Kreissl and Bicker，1992）。机械性分离虽然是分离幼虫神经细胞的一种经济、简便、有效的方法，但在成年昆虫，这种机械吹打的强度和次数往往导致细胞活力低下（Cayre *et al*.，1998）。为了能获得活力好数量又足够多的成年蜜蜂神经细胞，我们采取酶解和机械分离相结合的方法。消化酶选择作用温和的木瓜酶。这样既避免酶过度消化对细胞可能造成的损伤，又减少机械吹打的强度和次数对细胞的影响，因而获得的细胞状态好、分散的细胞数量多，满足了进一步的实验需要。最近，已有文献报道胶原酶/分散酶酶解加机械分离相结合分离成年蜜蜂脑神经细胞的方法（Devaud *et al*.，2007），但我们使用了更为温和的木瓜酶。

用全细胞膜片钳的记录方法，我们获得了急性分离的成年蜜蜂神经细胞的基本电生理学特征。文献已有培养的蜜蜂幼虫蘑菇体 Kenyon 细胞的电生理研究报道（Schäfer *et al*.，1994；Grünewald *et al*.，2003）。由于我们分离的蜜蜂脑组织来自前脑、中脑和后脑，因此分离的细胞是混合的，但 Kenyon 细胞的电容很小，只有几个 pF（Schäfer *et al*.，1994；Wüstenberg *et al*.，2004），而我们记录的神经细胞的电容在 17 pF 左右，比 Kenyon 细胞大得多。我们记录细胞的膜电位，膜阻抗及无自发放电等特征与蜜

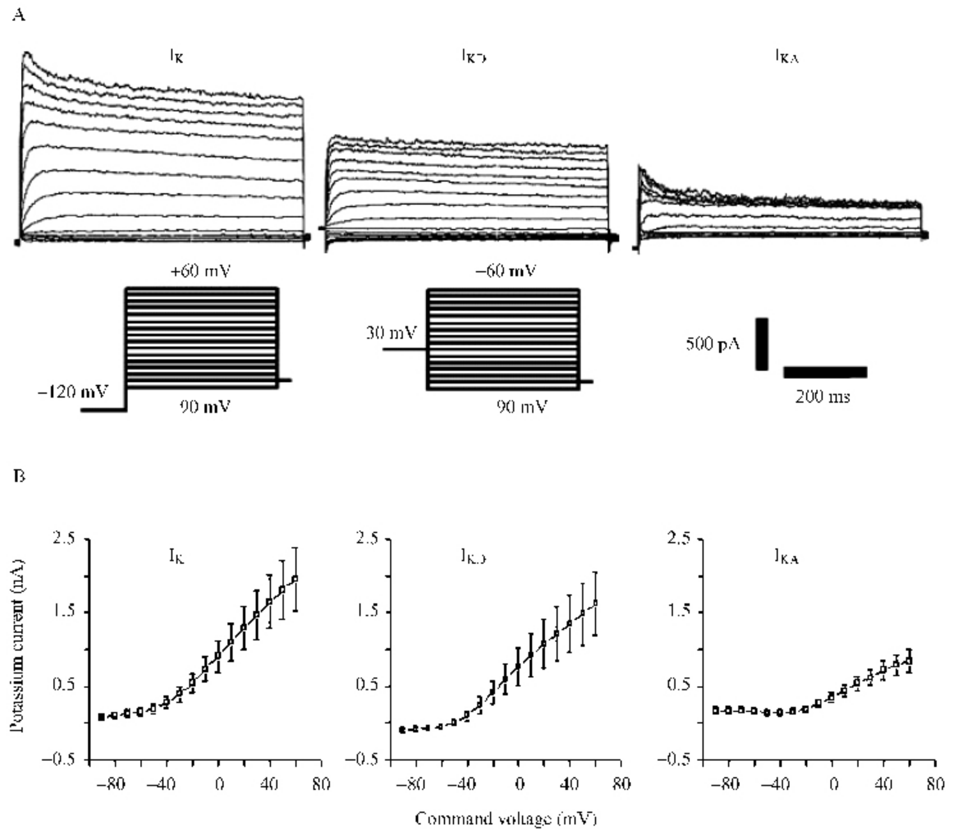

图 4　成年意蜂脑神经细胞钾电流

Fig. 4　Potassium currents recorded in the adult *Apis mellifera* brain neurons

A：I_K，总钾电流，去极化电压从 −120 mV 到 +60 mV 激活总钾电流；I_{KD}，缓慢失活钾电流，去极化电压从 −30 mV 到 +60 mV 主要激活缓慢失活钾电流。I_{KA}，快速失活钾电流，上两种去极化电压激活的电流相减代表快速失活钾电流。B：分别为 I_K，I_{KD}以及 I_{KA}的电流-电压关系曲线。A：I_K，net whole cell K^+ current，was recorded from a neuron in response to voltage steps (400-ms duration，10-mV increments) between −120 and +60 mV from a holding potential of −120 mV. I_{KD}，sustained potassium current，was evoked by applying voltage steps (each 400 ms) in increments of 10-mV steps from −120 to +60 mV from a holding potential of −30 mV in the same neuron. I_{KA}，fast inactivating potassium current. Traces were obtained by off-line subtraction of I_{KD} from I_K. B：Current-voltage curves for I_K，I_{KD} and I_{KA}，respectively.

蜂幼虫的 Kenyon 细胞类似（Laurent *et al*.，2002；Wüstenberg *et al*.，2004）。

用短时程电刺激，我们获得了成年意蜂脑神经细胞动作电位的形态特征。动作电位的 APD，AHP 等与文献报道的蜜蜂运动神经元类似（Kloppenburg *et al*.，1999），但我们观察到的动作电位的幅度比文献报道的要大（Kloppenburg *et al*.，1999；Laurent *et al*.，2002）。这种差异一方面可能反应了不同细胞钠离子通道的差别，另一方面，也可能是由于诱发动作电位的实验条件的不同，长时程的刺激可能会影响动作电位的形态。

给予神经细胞去极化刺激，引起细胞放电是神经细胞具有兴奋性的体现。从报道的文献来看，蜜蜂脑神经细胞放电的特征有两种（Laurent *et al*.，2002；Wüstenberg *et al*.，2004），一种是反复放电，阈电流刺激引起 2 个以上的动作电位，另一种是单次放电，阈电流刺激仅引起 1 个动作电位。如去极化通常引起幼虫 Kenyon 细胞反复放电（Laurent *et al*.，2002），而我们记录细胞的一个显著特点是去极化只引起一次放电，细胞放电后即产生适应（adaptation）。这种差异是否由于幼虫或成年蜜蜂神经细胞的差异还是 Kenyon 细胞与非 Kenyon 细胞之间的差异有待进一步探讨。但根据 Perez-Orive 等（2002）提出的假设，Kenyon 细胞的反复放电是持续嗅觉刺激的结果，我们记录的细胞的快速适应可能是这类细胞本身的功能特点所决定的。

钠电流和钾电流是神经细胞具有兴奋性的基础。在我们记录的细胞中，去极化引起的膜电流既有快速失活的内向钠电流，也有外向的钾电流，与文献报道的其他昆虫或蜜蜂蛹的神经细胞的电流成份

类似，钠电流或钾电流的激活和失活特征与其他昆虫或蜜蜂的神经细胞也基本相同（Schäfer *et al*.，1994；Cayre *et al*.，1998；Laurent *et al*.，2002）。

与文献报道的 Kenyon 细胞的钾电流相比，本文记录细胞钾电流的显著特点是钾电流成份以 I_{KD} 为主，I_{KA} 的成份很少。钾电流中，I_{KD} 主要加速动作电位的复极化，而 I_{KA} 主要影响膜电位去极化后产生的放电频率（Connor and Stevens，1971；Tierney and Harris-Warrick，1992；Hille 2001）。在本文记录到的以 I_{KD} 为主的钾电流可能是我们记录到的神经细胞单次放电原因之一。在蜜蜂蛹的 Kenyon 细胞或成年蜜蜂的运动神经细胞中，都观察到部分细胞的 I_{KA} 成份突出（Kloppenburg *et al*.，1999；Laurent *et al*.，2002），而这类细胞在阈电流刺激后往往呈现反复放电的特征，进一步提示 I_{KA} 成份与神经细胞的放电频率相关。有趣的是，I_{KA} 大小具有性别差异。Laurent 等（2002）发现，与工蜂相比，雄蜂的嗅觉受体神经元（olfactory receptor neuron，ORN）的钾电流中，I_{KA} 特别显著，并推测这种差异与寻求和蜂王交配有关。钾电流除了 I_{KD} 和 I_{KA} 外，还存在钙激活钾电流，呈现“N”型激活曲线（Schäfer *et al*.，1994），但在我们的记录中，由于使用了钙通道的阻断剂，钾电流中没有钙激活钾电流成份。

本文通过电压激活记录到的内向电流，虽然没有用钠通道阻断剂 TTX 验证但在外液无 Na^+ 时消失，提示这种内向电流是钠电流。分析内向电流的激活和失活特征，与蜂蛹的 Kenyon 细胞、成蜂的嗅觉受体神经元等细胞的钠电流的电压依赖的激活和失活基本相同，进一步证明我们记录到的内向电流是钠电流。复习文献发现，昆虫神经细胞的钠电流失活迅速，对 TTX 敏感，基本都属于 TTX-S 型钠电流。蜜蜂嗅觉受体神经元在 TTX 作用后，动作电位不能产生（Laurent *et al*.，2002），证明蜜蜂神经细胞上的钠通道的激活是动作电位产生的基础。我们进一步分析钠通道的激活电压和动作电位产生的阈电位水平也提示，钠电流在指令电压为 $-40 \sim -30$ mV 左右激活，与动作电位产生的阈电位接近（-27.4 ± 2.3 mV），表明在成年意蜂脑神经细胞记录到的钠电流与动作电位的发生密切相关。

参 考 文 献（References）

Anderson P，Storm J，Wheal HV，1987. Thresholds of action potentials evoked by synapses on the dendrites of pyramidal cells in the rat hippocampus *in vitro*. *J*. *Physiol*.，383：509－526.

Barbara GS，Zube C，Rybak J，Gauthier M，Grünewald B，2005. Acetylcholine，GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee，*Apis mellifera*. *J*. *Comp*. *Physiol*.，191(9)：823－836.

Cayre M，Buckingham SD，Strambi A，Strambi C，Sattelle DB，1998. Adult insect mushroom body neurons in primary culture：cell morphology and characterization of potassium channels. *Cell Tissue Res*.，291(1)：537－547.

Connor JA，Stevens CF，1971. Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J*. *Physiol*.，213(1)：31－53.

Devaud JM，Blunk A，Podufall J，Giurfa M，Grünewald B，2007. Using local anaesthetics to block neuronal activity and map specific learning tasks to the mushroom bodies of an insect brain. *Eur*. *J*. *Neurosci*.，26(11)：3 193－3 206.

Grünewald B，2003. Differential expression of voltage-sensitive K^+ and Ca^{2+} currents in neurons of the honeybee olfactory pathway. *J*. *Exp*. *Biol*.，206(Pt 1)：117－129.

Hille B，2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates Inc.，Sunderland，MA，USA. 136－142.

Kloppenburg P，Kirchhof BS，Mercer AR，1999. Voltage-activated currents from adult honeybee (*Apis mellifera*) antennal motor neurons recorded *in vitro* and *in situ*. *J*. *Neurophysiol*.，81(1)：39－48.

Kreissl S，Bicker G，1992. Dissociated neurons of the pupal honeybee brain in cell culture. *J*. *Neurocytol*.，21(8)：545－556.

Laurent S，Masson C，Jakob I，2002. Whole-cell recording from honeybee olfactory receptor neurons：ionic currents，membrane excitability and odourant response in developing worker bee and drone. *European Journal of Neuroscience*，15(7)：1 139－1 152.

Ou XM，Huang MZ，Wang XG，Fan DF，2003. Insect resistant target sites and their roles in discovery of novel insecticides. *Modern Agrochemicals*，2：11－15. [欧晓明，黄明智，王晓光，樊德方，2003. 昆虫抗性靶标部位及其在杀虫剂创制中的作用. 现代农药，2：11－15]

Perez-Orive J，Mazor O，Turner GC，Cassenaer S，Wilson RI，Laurent G，2002. Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science*，297(5 580)：359－365.

Pusch M，Neher E，1988. Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch*.，411(2)：204－211.

Schäfer S，Rosenboom H，Menzel R，1994. Ionic currents of Kenyon cells from the mushroom body of the honeybee. *J*. *Neurosci*.，14(8)：4 600－4 612.

Soderlund DM，Clark JM，Sheets LP，Mullin LS，Piccirillo VJ，Sargent D，Stevens JT，Weiner ML，2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity：implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*，171(1)：3－59.

Tierney AJ，Harris-Warrick RM，1992. Physiological role of the transient potassium current in the pyloric circuit of the lobster stomatogastric ganglion. *J*. *Neurophysiol*.，67(3)：599－609.

Wüstenberg DG，Boytcheva M，Grünewald B，Byrne JH，Menzel R，Baxter DA，2004. Current- and voltage-clamp recordings and computer simulations of Kenyon cells in the honeybee. *J*. *Neurophysiol*.，92(4)：2 589－2 603.

（责任编辑：赵利辉）